

Abstract

O. V. Rusanov,
Y. D. Chumachenko,
*MI "Sumy City Clinical Hospital
№5", 2 Marco Vovchok str., Sumy,
Ukraine 40000*

**ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE C677T
POLYMORPHISM IN THE METHYLENETETRAHYDRO-
FOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENE IN PATIENTS WITH
TYPE 2 DIABETES MELLITUS COMPLICATED BY DIABETIC
FOOT SYNDROME**

Introduction. Diabetic foot syndrome complicates the course of diabetes mellitus in 4–25 % of patients. The identification of the genetic components of type 2 diabetes is the most important part of research in diabetes, since the identification of candidate genes for diabetes will influence all efforts to understand the pathogenesis of the disease, its complications, diagnosis, treatment and prevention.

Purpose. The purpose of the study was to investigate the possible connection of the C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene with the development of diabetic foot syndrome.

Materials and Methods. The subject of the study was 154 patients with type 2 diabetes, complicated by diabetic foot syndrome, and 124 practically healthy individuals. To determine the polymorphism of the C677T gene, a polymerase chain reaction method was used, followed by an analysis of the length of the restriction fragments. The static analysis was performed using the SPSS 17.0 software package

Results. The distribution of homozygotes by the main allele (C/C), heterozygote (C/T) and homozygote in the minor allele (T/T) among patients with DFS was 39.0 %, 46.8 % and 14.3 %, respectively, in practically healthy people – 46 %, 48.4 %, 5.6 % respectively ($P = 0.056$ for χ^2 -Pearson criteria). In homozygote T / T, the risk of developing DFS is greater than that of carriers of the main allele (C/C and C/T) (OR = 2.79; $P = 0.02$).

Conclusion. The MTHFR gene of the C677T-polymorphism is associated with the development of diabetic foot syndrome in the Ukrainian population. In the homozygote for the minor allele T / T, the risk of developing VDS is greater than that of the carriers of the minor allele.

Keywords: diabetic foot syndrome, diabetes mellitus, endothelial dysfunction, gene polymorphism, methylene tetrafolate reductase.

Corresponding author: *doctor_olek@ukr.net*

Резюме

О. В. Русанов,
Я. Д. Чумаченко,
*Комунальна установа «Сумська
міська клінічна лікарня №5»,
вул. Марко Вовчок, 2, м. Суми,
Україна, 40000*

**АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ С677Т ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА
МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ (МТНFR)
З РОЗВИТКОМ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ
У ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ**

У роботі представлено результати визначення С677Т поліморфізму гена МТНFR у 154 хворих на цукровий діабет 2 типу, ускладнений синдромом діабетичної стопи (СДС) та 67 осіб контрольної групи. Розподіл гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Т) та гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) у хворих на СДС ста-

новив – 39,0 %, 46,8 % та 14,3 %, а серед практично здорових осіб – 46 %, 48,4 %, 5,6 % відповідно ($P = 0,056$ за χ^2 -критерієм Пірсона). У гомозигот Т/Т ризик виникнення СДС більший, ніж у носіїв основного алеля (С/С і С/Т) ($OR = 2,79$; $P = 0,02$).

Ключові слова: синдром діабетичної стопи, цукровий діабет, ендотеліальна дисфункція, поліморфізм генів, метилентетрафолатредуктаза.

Резюме

А. В. Русанов,

Я. Д. Чумаченко,

Коммунальное учреждение
«Сумская городская клиническая
больница №5», ул. Марко Вовчок,
2, г. Сумы, Украина

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ С677Т ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (МТНFR) С РАЗВИТИЕМ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

В работе представлены результаты определения С677Т полиморфизма гена МТНFR у 154 пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложнённым синдромом диабетической стопы (СДС) и 67 лиц контрольной группы. Распределение гомозигот по основному аллелю (С/С), гетерозигот (С/Т) и гомозигот по минорному аллелю (Т/Т) у пациентов с СДС составлял 39,0 %, 46,8 % и 14,3 %, а среди практически здоровых лиц – 46 %, 48,4 %, 5,6 % соответственно ($P = 0,056$ по χ^2 -критерию Пірсона). У гомозигот Т/Т риск возникновения СДС выше, чем у носителей основного аллеля (С/С и С/Т) ($OR = 2,79$; $P = 0,02$).

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, сахарный диабет, эндотелиальная дисфункция, полиморфизм генов, метилентетрафолатредуктаза.

Автор, відповідальний за листування: doctor_olek@ukr.net

Вступ

Цукровий діабет, ускладнений синдромом діабетичної стопи (СДС), набув останнім часом значної актуальності у високорозвинених країнах світу, у тому числі й в Україні, про що свідчить високий рівень фатальних наслідків, ампутацій нижніх кінцівок та місце, яке посідає синдром діабетичної стопи серед складних медично-соціальних проблем, що вимагають значних інтелектуальних, організаційних і економічних ресурсів для їх розв'язання [1–3].

Дослідницькою групою ВООЗ з цукрового діабету в Женеві у 1987 році СДС вперше був відокремлений як самостійне захворювання. Даний синдром ускладнює перебіг цукрового діабету у 4–25 % пацієнтів. Ризик виникнення гангрени нижніх кінцівок у хворих в 20 разів вищий, ніж в загальній популяції. В Україні щорічно реєструється більше 7 тисяч гангрени нижніх кінцівок, серед яких 70 % гангрени відмічається у пацієнтів із цукровим діабетом другого типу (ЦД 2 типу). Практично кожен хвилину у світі виконується ампутація з приводу СДС. Відсоток післяопераційних усклад-

нень у таких хворих сягає 37 %, а післяопераційна летальність становить 9–26 % [1] Різні аспекти цієї проблеми інтенсивно вивчаються ендокринологами, судинними та гнійними хірургами, неврологами, ортопедами, патофізіологами, генетиками практично у всіх розвинених країнах світу [1].

Ідентифікація генетичних компонентів ЦД 2 типу є найбільш важливою частиною досліджень у вивченні хвороби, оскільки з'ясування генів-кандидатів розвитку діабету буде впливати на всі зусилля до розуміння патогенезу хвороби, її ускладнень, діагностики, лікування та профілактики [4].

У патогенезі СДС важливу роль відіграє порушення функцій ендотелію. Розвиток макро- та мікроангіопатій при СДС напряму пов'язаний із підвищенням рівня гомоцистеїну у плазмі крові [5]. Доведено, що основною причиною збільшення концентрації гомоцистеїну є генетична схильність, а саме точкові мутації у гені метилентетрагідролатредуктази (МТНFR). Описано біля 700 однонуклеотидних поліморфізмів гена МТНFR, 20 з яких призво-



дять до суттєвих порушень функції ферменту. Найбільш вивченим є поліморфізм 4-го екзону С677Т (Ala222Val, rs1801133) – заміна амінокислоти аланін на валін у сайті зв'язування фолату. У різних популяціях світу доведено, що поліморфізм С677Т асоційований з розвитком ускладнень у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу – діабетичною ретинопатією, нефропатією та діабетичною стопою [5; 6; 7; 8, 9].

Тому, **метою нашого дослідження** було вивчення асоціації С677Т поліморфізму гена МТНFR з розвитком СДС у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу у осіб північно-східного регіону України.

Подану роботу виконано в рамках науково-дослідної теми «Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб» (№ держреєстрації 0110 У 005038).

Матеріал і методи. У дослідженні використано кров 154 хворих на цукровий діабет 2-го типу, ускладнений на синдром діабетичної стопи, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в КУ Сумської міської ради «Сумська міська клінічна лікарня №5» у відділеннях судинної хірургії та відділенні хірургії №3 протягом 2011–2013 років. Діагноз СДС виставлявся на основі наказу МОЗ України від 21.12.2012 № 1118 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при цукровому діабеті 2 типу». Оцінка стану кінцівок включала виявлення виразок або ампутації стопи в анамнезі, симптомів захворювання периферичних артерій, труднощів, які долаються пацієнтом при догляді за ногами внаслідок порушень зору або фізичного стану; виявлення зміни кольору шкіри на нижніх кінцівках; виявлення деформацій стопи (молоткоподібні або кігтеподібні пальці, кісткові виступи) і огляд взуття, виявлення видимих ознак нейропатії (суха шкіра, мозолі, розширені вени), початкових стадій ішемії, деформації або ураження нігтів. Неврологічний статус оцінювався згідно оцінки діабетичної нейропатії. Визначалися порушення чутливості стопи (вібраційна, больова, температурна, тактильна). Оцінка стану артеріального кровотоку включала пальпаторне визначення його рівня та оцінку симетричності пульсації на судинах нижніх кінцівок. Недостатність артеріального кровотоку нижніх кінцівок оцінювалася за класифікацією Фонштейна–Лериша–Покровського. З інструментальних методів дослідження використовувалися дуп-

лексне ультразвукове сканування артерій нижніх кінцівок, реовазографія та ангиографічне дослідження. Дуплексне ультразвукове сканування артерій нижніх кінцівок виконувалося за допомогою багаточільового ультразвукового сканеру з кольоровим доплером Kontron Imagic Maestro виробництва Франції. Реовазографія проводилася на комп'ютерному діагностичному комплексі «Сфера 4» виробництва України. Ангіографічне дослідження на рентгендіагностичному комплексі Chiralux-2 виробництва Чехословаччини. Частині пацієнтів (за наявності показань) виконувалося рентгенологічне дослідження стоп та гомілковостопних суглобів та визначалися ознаки діабетичної остеоартропатії, деструкції кісток внаслідок гнійно-некротичних уражень, кальцифікація медіального шару артеріальної стінки. Також проводилось бактеріологічне дослідження вразкового ексудату для визначення мікрофлори та її чутливості до антибактеріальних препаратів. Лабораторні дослідження включали клінічний аналіз крові та сечі, визначення глюкози крові, глікемічного профіля, глікозильованого гемоглобіну.

Контрольна група представлена 124 особами віком від 40 до 83 років без цукрового діабету та порушень толерантності до глюкози. Відсутність інших мультифакторіальних хвороб підтверджувалася шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску, проведення біохімічних досліджень.

Дослідження проводилось з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини, Хельсинської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини (1964 р., з наступними доповненнями, включаючи версію 2000 р.) і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Всі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженнях з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Визначення алельного поліморфізму 4-го екзону С677Т (rs1801133) гена МТНFR проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти («Sarstedt», Ні-



меччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі - 20 °С. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория «Изоген», Росія) згідно протоколу виробника. Ампліфікацію ділянки гена, що містить С677Т поліморфний сайт, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5' GTCATCCSTATTTGGCAGGTTAC 3' і зворотного (antisense) – 5' CTGAGAGGAGATCTGGGAAGAA 3' («Metabion», Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази («Ферментас», Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента, що містив стартову ділянку, складалася з 33 циклів: денатурація – 94 °С (50с), гібридизація праймерів – 64,5 °С (45 с) і елонгація – 72 °С (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С протягом 20 годин з 3 ОД рестриктази HinfI («Thermo Scientific», США) у буфері R такого складу: 10 мМ тріс-НСl (рН 8,5), 10 мМ MgCl₂,

100 мМ КСl, 0,1 мг/мл альбумину. Наявність у 677 позиції гена MTHFR цитозину перешкоджає рестрикції, а при його заміні на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 334 пари азотистих основ) на два фрагменти – 241 і 93 пари основ (рис. 1). Ампліфікати вивченого фрагмента гена MTHFR після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія). Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS–17. При цьому вірогідність відмінностей визначили за χ^2 -критерієм Пірсона.

Результати дослідження та їх обговорення. Частоту трьох можливих варіантів генотипу за С677Т поліморфізмом гена MTHFR, мінорного та основного алелів, а також перевірку відповідності розподілів рівновазі Харді-Вайнберга подано в табл. 1. Показано, що співвідношення основних і мінорних алелів в обох групах за вивченими поліморфізмами істотно не відрізняються від очікуваних ($P > 0,05$).

Таблиця 1 – Частота алельних варіантів і алелів за С677Т-поліморфізмом гена MTHFR у контрольній групі і у хворих із синдромом діабетичної стопи

| Генотип | Контрольна група | Хворі з СДС |
|-------------------------|------------------|-------------|
| Гомозиготи С/С, n (%) | 57 (46,0) | 60 (39,0) |
| Гетерозиготи С/Т, n (%) | 60 (48,4) | 72 (46,8) |
| Гомозиготи Т/Т, n (%) | 7 (5,6) | 22 (14,2) |
| С-алель | 0,7 | 0,62 |
| Т-алель | 0,3 | 0,38 |
| χ^2 | 3,0 | 0 |
| P | > 0,05 | > 0,05 |

Примітка: n – кількість пацієнтів, χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді-Вайнберга

На рис. 1 наведено частоту різних алельних варіантів – гомозигот за основним алелем (СС), гетерозигот (СТ) та гомозигот за мінорним алелем (ТТ) за поліморфізмом С677Т гена MTHFR у пацієнтів, хворих на ЦД 2-го типу, ускладнений СДС та осіб без цієї недуги.

Аналіз частоти генотипів за С677Т-поліморфізмом гена MTHFR показав, що в контрольній групі співвідношення між гомозиготами за основним С-алелем (С/С), гетерозиготами (С/Т) і гомозиготами за мінорним Т-алелем (Т/Т) складало 46,0 %, 48,4 % і 5,6 %,



тимчасом як у хворих із синдромом діабетичної стопи відповідні показники дорівнювали 39,0 %, 46,8 % і 14,2 %. Відмінності у розподілі генотипів між групами порівняння виявилися близькими до рівня статистичної незначущості

($P = 0,056$). Використання методу логістичної регресії дозволило з'ясувати, що у носіїв Т/Т-генотипу ризик настання СДС більший, ніж носіїв основного алелю ($OR = 2,79$; $P = 0,02$).

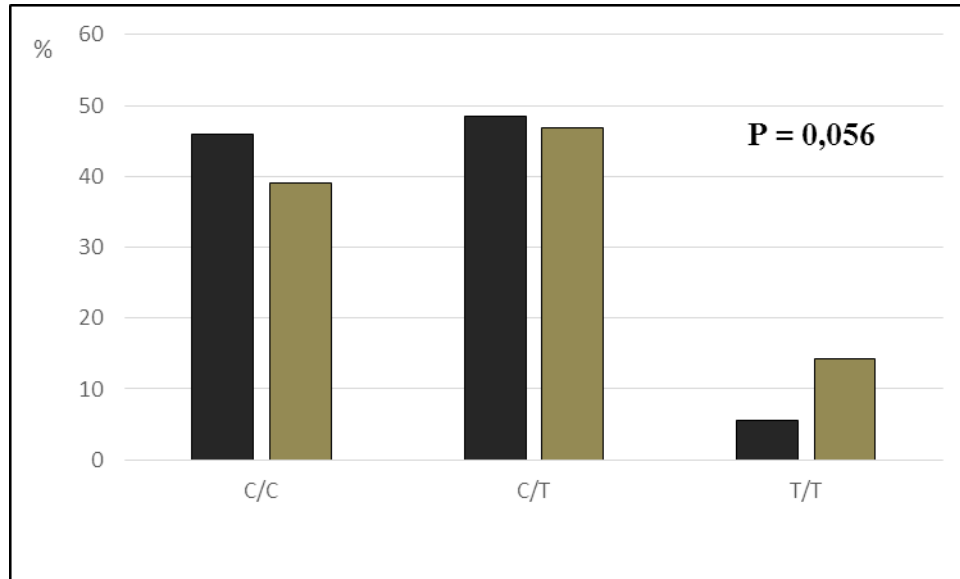


Рисунок 1 – Частота алельних варіантів гена МТНFR за С677Т-поліморфізмом у хворих із синдромом діабетичної стопи (сірі стовпчики) і в контрольній групі (чорні стовпчики); P – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Ген МТНFR у людини локалізований на короткому плечі 1 хромосоми (1p36.3). Він знаходиться на мінус-ланцюгу, має довжину 20335 п.н. і складається з 11 екзонів, які розділені 10 інтронами [10]. Екзони мають довжину від 102 до 432 п.н., 9 інтронів – від 250 до 1500 п.н. і 1 інтрон – 4200 п.н. Промотор гена МТНFR містить характерні для більшості генів СААТ і GC-бокси, а також регуляторні елементи – SN1, AP1, AP2. Існує близько 638 алельних варіантів цього гена [11], що викликають важку недостатність ферменту, але більшість з цих варіантів рідкісні. Одним з клінічно значущих поліморфізмів гена МТНFR є варіант, при якому відбувається заміна амінокислотного залишку аланіну на залишок валіну в сайті зв'язування фолату (поліморфізм С677Т (Ala222Val) гена МТНFR, rs1801133). У результаті мутації утворюється варіант ферменту з порогом термолабільності 55 °С, що має вдвічі знижену активність. У гомозигот за Т-алелем активність ферменту *in vitro* знижена на 70 %, а у гетерозигот – на 35 %. При зниженні активності МТНFR порушується доставка і метаболізм фолієвої кислоти, що призводить до накопичення гомоцистеїну в плазмі крові і розвитку гіпергомоцистеїнемії. [12;13].

Аналізуючи дослідження, спрямовані на вивчення зв'язку поліморфізму С677Т гена МТНFR з різними мультифакторіальними захворюваннями виявлено, що цей SNP має найбільшу асоціацію з захворюваннями кровоносних судин і серця [14–17], онкологічними захворюваннями [18–20], нейрокогнітивними захворюваннями [21].

Роботи Strain et al. виявили, що особи з 677ТТ генотипом більш схильні до підвищеного рівня гомоцистеїну плазми крові, а в більшості популяцій мають значно вищий ризик серцево-судинних захворювань [22]. Alghashama et al. довели, що С677Т поліморфізм гена МТНFR пов'язаний з ризиком гіпертонії, особливо у пацієнтів з ожирінням та діабетом серед населення Саудівської Аравії [23]. На синергічний ефект МТНFR-мутацій з рівнем гомоцистеїну та ризиком розвитку ішемічного інсульту вказує робота Almawi WY et al. [23]. Показана асоціація С677Т-поліморфізму з діабетичною ретинопатією у турецькій популяції [24]. Встановлено, що у представників російської популяції носійство 677Т-алелю асоційоване з підвищеним ризиком розвитку діабетичної ангіопатії нижніх кінцівок у чоловіків з цукровим діабетом, що палять [25].

Висновки

1. С677Т поліморфізм гена МТНFR асоційований з розвитком синдрому діабетичної стопи в українській популяції.

2. У гомозигот за мінорним алелем Т/Т ризик розвитку СДС більший, ніж у носіїв мінорного алеля.

References (список літератури)

- Shlapak IP, Galysko OA. [Diabetes. A view from the position of an anesthetist] Kiev: Kniga plus, 2010.160p.
- Yehuda H, Zachary T. Bloomgarden, et al. Updated Clinical Recommendations on diagnostics and treatment of diabetes mellitus American Association of Clinical Endocrinology (AAACE) and American College of Endocrinology (ACE), 2015. Diabetes. Adiposity. *Metabolic syndrome* 2015, 4: 17–21.
- Liapis MO, Herasimchuk PO. [The syndrome of diabetics foot] Ternopil: Ukrmedkniha, 2001. 276 p.
- Das SK: Genetic epidemiology of adult onset type 2 diabetes in asian indian population: past, present and future. *Int J Hum Genet* 2006, 6(1):1–13.
- Rebecca LP, Mary M et al Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2005, 4–17
- Pollex RL, Mamakeesick M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4–17. [PubMed: 16274479]
- Russo GT, Di Benedetto A, et al. Mild hyperhomocysteinemia, C677T polymorphism on methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of macroangiopathy in type 2 diabetes: a prospective study. *Acta Diabetol.* Nov 25;2009
- Ciccarone E, Di Castelnuovo A, et al. Homocysteine levels are associated with the severity of peripheral arterial disease in Type 2 diabetic patients.; GENDIABET Investigators. Volume 48, Issue 4, Pages 897–904.e1
- Surovi H, Brian H. Annex. Biomarkers and Genetics in Peripheral Artery Disease. *Clin Chem.* 2017 Jan; 63(1): 236–244.
- Goyette P, Pai A, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998 Aug;9(8):652–6.
- Sibani S, Christensen B. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat.* 2000;15(3):280–7.
- Frosst P, Blom HJ, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111–3.
- Fetisova IN, Dobrolubov AS, et al. Polymorphism of genes of folate metabolism and human disease. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* 2007; 1: 23–28.
- Isordia-Salas I, Trejo-Aguilar A, et al. C677T polymorphism of the 5,10 MTHFR gene in young Mexican subjects with ST-elevation myocardial infarction. *Arch Med Res.* 2010 May;41(4):246–50.
- Abdullah A, Ahmad AS, et al. Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with hypertension. *International Journal of Health Sciences, Qassim University.* 2012. – Vol. 6(1).– P. 1433.
- Poduri A, Mukherjee D, et al. MTHFR A1298C polymorphism is associated with cardiovascular risk in end stage renal disease in North Indians. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007, 308(1–2):43–50.
- Almawi WY, Khan A, et al. Case-control Study of methylenetetrahydrofolate reductase mutations and hyperhomocysteinemia and risk of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2009 Sep-Oct;18(5):407–8.
- Fernández-Peralta AM, Daimiel L, et al. Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal



- cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Feb;25(2):141-51.
19. Fedota OM, Roshcheniuk LV, et al. Analysis of association of a gene of epidermal differentiation complex with dermatologic and gynecologist diseases. *Health Of Woman.* 2015.1(97):192–194.
20. Lissowska J, Gaudet MM, et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer.* 2007 Jun 15;120(12):2696–703.
21. Zan T, Lei W, et al. The 677C>T (rs1801133) Polymorphism in the MTHFR Gene Contributes to Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 71 Research Studies. *PLoS One.* 2013; 8(2): e55332. Published online 2013 Feb 20. doi: 10.1371/journal.pone.0055332.
22. Strain JJ, Dowey L, et al. B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD. *Proc Nutr Soc.* 2004 Nov;63(4):597–603.
23. Alghashama A, Ahmad A, Settina et al. Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with hypertension. *International Journal of Health Sciences, Qassim University.* 2012. – Vol. 6(1).– P. 1433.
24. Serbulent Y, Nevin K, et al. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2013; 19: 1626–1630.
25. Vasilieva YI, Bushueva OY, et al. Smoking as a precipitating factor in the development of diabetic angiopathy of lower extremities in men with methylenetetrahydrofolatereductase 677TT genotype. *Klin. med.* 2015;93(7) p 45–49.

(received 17.12.2017, published online 01.04.2018)

(одержано 17.12.2017, опубліковано 01.04.2018)

